



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Final de Grado

Caracterización taxonómica de nuevas cepas bacterianas del grupo de *Pseudomonas fluorescens*

Aina Adrover Garcia

Grado de Biología

Año académico 2014-15

DNI de l'alumne: 43210380G

Treball tutelat per Jordi Lalucat Jo
Departament de Biología (àrea de Microbiologia)

NO

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Palabras clave del trabajo:
WC-MALDI-TOF, filogenia, *Pseudomonas*, *P. fluorescens*

Índice

RESUMEN Y ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Género <i>Pseudomonas</i>	4
1.2 Taxonomía y filogenia	4
1.3 Identificación de <i>Pseudomonas</i>	6
1.4 Espectrometría de masas MALDI-TOF de células enteras	7
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	7
3. METODOLOGÍA	7
3.1 Cepas bacterianas	7
3.2 Condiciones de cultivo	9
3.3 Curvas de crecimiento	9
3.4 Protocolo MALDI-TOF	9
4. RESULTADOS	9
4.1 Curvas de crecimiento	9
4.2 Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF	14
4.3 Dendrograma	16
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	16
5.1 Curvas de crecimiento	
5.2 Identificación mediante secuencia parcial del gen <i>rpoD</i>	17
5.3 Identificación mediante espectrometría de masas	17
5.4 Dendrograma y asociaciones proteicas	18
5.5 Conclusiones	18
6. AGRADECIMIENTOS	19
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

Resumen

Pseudomonas es un género conocido por su amplia diversidad fenotípica, por este motivo, para su identificación hay que recurrir a técnicas de secuenciación de genes que diferencien especies dentro del género. La combinación de estas técnicas con métodos de análisis quimiotaxonómicos permite obtener una identificación significativamente fiable. En este estudio se realiza la caracterización bacteriana mediante MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption-ionization (MALDI) time-of-flight (TOF)), así como un análisis multigénico (MLSA) de las secuencias parciales de 4 genes (16RNAr, *rpoD*, *gyrB* y *rpoD*). Al concluir el estudio se realiza un dendrograma por UPGMA creado a partir de la matriz de semejanza del programa Biotyper con los agrupamientos proteicos de las cepas analizadas. El objetivo del trabajo es caracterizar los perfiles proteicos de células enteras de una serie de cepas del género *Pseudomonas* que no han podido ser adscritas a ninguna especie conocida del género, determinar su posición filogenética y clasificarlas taxonómicamente.

Abstract

Pseudomonas is a well known bacterial genus for its wide phenotypic diversity. Consequently, for the identification of species in the genus the use of gene sequencing techniques is necessary. The combination of these techniques with chemotaxonomic methods provides a reliable identification. In this study, bacterial strain are characterized is by MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) time-of-flight is performed (TOF)) and by a multigenic analysis (MLSA) of partial sequences of four genes (16RNAr, *rpoD*, *gyrB* and *rpoD*). Protein profiles obtained with the Biotyper program were analyzed and results were represented in a dendrogram by UPGMA that represents phenotypic similarities between the strains. The purpose of the study is the characterization of the whole cell protein profiles of strains of the genus *Pseudomonas* that could not be assigned to any known species of the genus, to determine their phylogenetic position and to classify them taxonomically.

1. Introducción

1.1 Género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* está constituido por bacterias aeróbicas de considerable importancia práctica y científica. Son organismos con una gran versatilidad metabólica y una gran plasticidad genética que, gracias a unos requerimientos nutricionales sencillos y una gran capacidad de adaptación han sido capaces de colonizar prácticamente cualquier nicho ecológico. Se trata de organismos ubicuos en ecosistemas terrestres y acuáticos, considerados también importantes como patógenos de humanos, plantas y animales. (Palleroni, 1992; Schroth et al., 1992).

Éste género es conocido también por su gran heterogeneidad fenotípica (Clark and Ornston, 1975 ; Clark and Richmond, 1975; Palleroni, 1975). Las especies que pertenecen a este grupo, en general, crecen rápidamente sobre prácticamente cualquier tipo de sustrato, incluso sobre sustancias orgánicas tóxicas como los hidrocarburos aromáticos. Algunas especies han sido encontradas en muestras de agua de grifo y en soluciones salinas hospitalarias, que presumiblemente carecen de nutrientes. Ciertas cepas del género *Pseudomonas*, además, han desarrollado resistencia a antibióticos, desinfectantes, metales pesados y disolventes orgánicos.

La capacidad de *pseudomonas* de crecer a partir de un gran número de moléculas orgánicas de pequeño tamaño y peso molecular, apunta a una notable diversidad y un papel relevante en la microbiota quimiorganotrófica, ya que algunas cepas tienen una gran actividad en los ciclos de carbono en la naturaleza (Palleroni, 1978, 1992b,c, 2003).

Representan uno de los géneros de mayor relevancia dentro de los ecosistemas naturales; son numerosos los trabajos que profundizan sobre el efecto de algunas *Pseudomonas* que tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas, como *Pseudomonas fluorescens*, (Cook, 1993) siendo muy eficaces a la hora de controlar enfermedades radiculares producidas por hongos (O'Sullivan and O'Gara, 1992). Muchas de ellas son comúnmente utilizadas como agentes de control biológico, como *Pseudomonas protegens* (Palleroni et al. 2005). No obstante, algunas especies son patógenos importantes para los seres humanos, como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas baetica* en el caso de los animales y *Pseudomonas syringae* en el caso de las plantas.

En cuanto a las características taxonómicas del género, se trata de bacilos Gram negativos, no esporulados y oxidativos estrictos, ya que utilizan el oxígeno o, en ciertos casos, compuestos de nitrato

como aceptor de electrones bajo condiciones anaeróbicas, como *P. stutzeri* y algunos biovares de *P. fluorescens* (Stanier *et al.*, 1996) son móviles mediante flagelos polares (Palleroni, 1978). El diámetro de sus células es normalmente menor a 1 μm , no presentan apéndices y tampoco vainas. (Doudoroff and Palleroni, 1974; Palleroni, 1992b,2003). Las cepas pueden ser positivas o negativas para la oxidasa y siempre positivas para la catalasa. Algunas especies son capaces de acumular poli-beta-hidroxialcanoatos como material de reserva. (Palleroni, 2005 a,b).

1.2 Taxonomía y filogenia

Migula en 1894 describió el género *Pseudomonas* por primera vez en base a sus características morfológicas (Migula, 1900). La amplia variedad y heterogeneidad del género hizo que muchas de las especies de *Pseudomonas* fueran erróneamente descritas. No fue hasta 1966, gracias a la publicación de los trabajos de Stanier y colaboradores , que se pudieron fijar las bases de la clasificación taxonómica del género gracias a las características fisiológicas y bioquímicas. No obstante, debido a la gran heterogeneidad fenotípica de *Pseudomonas* ha sido necesario reevaluar los criterios de identificación a nivel molecular para esclarecer la taxonomía.

Éste género es uno de los más diversos, y su taxonomía ha sufrido grandes cambios desde sus primeras descripciones (Palleroni, 1984; Mulet *et al*, 2010). Actualmente, y gracias a la secuenciación parcial de los genes 16S RNAr, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*, se ha podido establecer la filogenia del género, tal como se muestra en la figura 1. Los métodos de caracterización taxonómica han ido avanzando a medida que lo hace la tecnología.

De esta manera, las determinaciones por características metabólicas o rasgos fenotípicos, que resultan de la expresión de unos genes determinados, han dejado paso a las técnicas de análisis molecular, donde se puede estudiar el genoma del organismo. Es por este motivo que la clasificación taxonómica de procariontes ha variado tanto en los últimos 20 años.

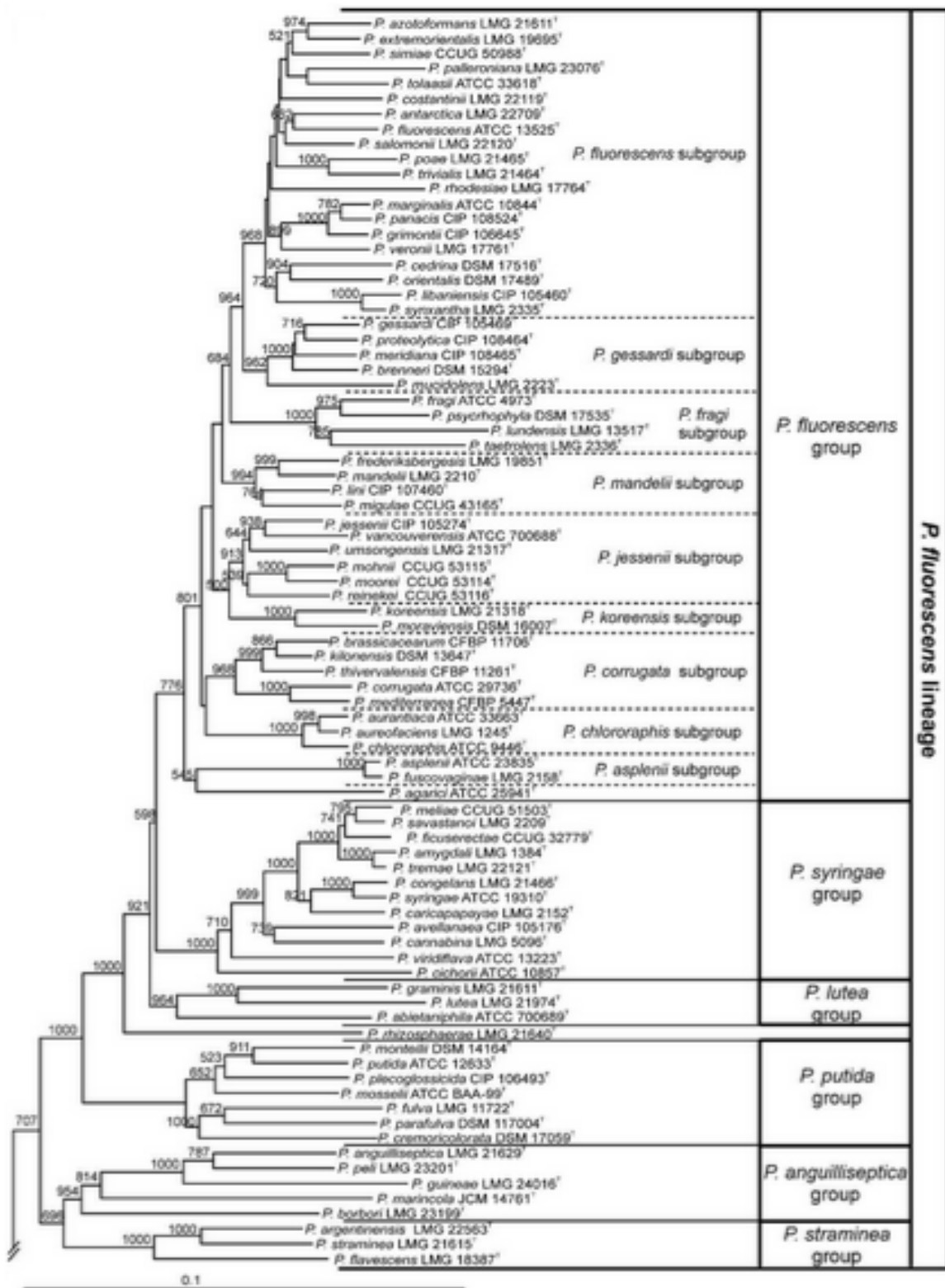


Figura 1. Árbol filogenético del linaje de *Pseudomonas fluorescens* obtenido al estudiar las cepas tipo de 135 especies de *Pseudomonas* basado en el análisis de secuencias parciales de los genes concatenados 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* (Mulet *et al.*, 2010).

1.3 Identificación de *Pseudomonas*

Dada la diversidad fenotípica de *Pseudomonas* hay que recurrir en muchos casos en la identificación a las técnicas de secuenciación de genes que diferencien a las especies dentro del género. Los más utilizados son los que se han empleado en la figura 1.

La secuencia del gen *rpoD* la que permite una mejor diferenciación entre las especies y es muy útil para la identificación (Scotta et al., 2013). No obstante, recientemente se está introduciendo la técnica de espectrometría de masas por MALDI-TOF para la caracterización quimiotaxonómica y para la identificación fenotípica de microorganismos por su sencillez, rapidez y economía.

1.4 Espectrometría de masas MALDI-TOF de células enteras

La caracterización bacteriana mediante MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption-ionization (MALDI) time-of-flight mass spectrometry (TOF/MS)) es capaz de determinar las masas moleculares de las proteínas mayoritarias que, previamente, han sido ionizadas y extraídas de células bacterianas enteras. La concordancia de esta técnica con los análisis filogenéticos en el género *Pseudomonas* está bien documentada (Scotta et al., 2013).

Las macromoléculas a analizar se sitúan sobre una matriz sólida, cuya composición dependerá de la muestra (α -ciano-4-hidroxicinámico para péptidos o DHB para moléculas de mayor tamaño molecular) para proteger la biomolécula de ser degradada. La muestra es entonces irradiada con un láser pulsado. Los iones generados se aceleran a lo largo de la matriz hacia el detector, generando un campo eléctrico.

El tiempo de vuelo de cada ion depende de su relación masa/carga. El detector mide el tiempo de vuelo de cada ion y calcula la masa de la molécula.

Se genera así un perfil de proteínas que es característico de cada especie bacteriana. La comparación de estos perfiles permite una buena identificación, pero los resultados de la identificación dependen significativamente de la base de datos utilizada.

2. Objetivos del estudio

El objetivo principal del presente trabajo es el de caracterizar los perfiles proteicos de células enteras de una serie de cepas del género *Pseudomonas*, que por sus características filogenéticas no se pueden adscribir a ninguna especie conocida del género.

Las cepas bacterianas a estudiar se han aislado de ambientes naturales y de muestras clínicas y se han caracterizado taxonómicamente mediante métodos de fisiología y bioquímica microbiana, así como por el análisis multigénico (MLSA) de las secuencias parciales de 4 genes (16RNAr, *rpoD*, *gyrB* y *rpoD*).

En segundo lugar se ha utilizado la herramienta Biotyper de Bruker Daltonics para comprobar su capacidad para identificar estos nuevos aislados. Determinar su posición filogenética mediante el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*. El análisis multigénico y la caracterización quimiotaxonómica nos ha de permitir adscribir taxonómicamente los aislados a alguna especie, o bien, describirlos como una especie nueva.

3. Metodología

3.1 Cepas bacterianas

En este estudio se lleva a cabo la identificación de cepas aisladas de origen clínico y ambiental, todas del género *Pseudomonas*. Contamos con 10 cepas procedentes de muestras clínicas, 5 de muestras de origen ambiental (fitopatógenos) y también con cuatro cepas tipo de referencia, filogenéticamente próximas, proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Universidad de les Illes Balears *P. fluorescens*, *P. synxantha*, *P. libanensis* y *P. azotoformans*.

Las muestras clínicas se han obtenido de la CCUG (Suecia) y del Hospital universitario de Son Espases (España). Las muestras ambientales proceden de una colaboración con el “Iranian Research Institute of Plant Protection, Amol Station”, Iran. En la Tabla 1. se indica el origen de cada una de las cepas, su fecha de aislamiento y la cepa tipo de la especie más próxima en la secuencia parcial del gen *rpoD* ya que éste es el gen que mejor discrimina entre las especies del género. La Tabla 4 representa la matriz de distancias filogenéticas (Jukes-Cantor) resultado de un análisis por MLSA de los genes 16S RNAr, *gyrB* y *rpoD* de las cepas objeto de estudio, próximas a *P. synxantha* y *P. libanensis* en el

subgrupo filogenético de *P. fluorescens*, definido por Mulet et al. (2010). El árbol filogenético correspondiente (Figura 2) se ha construido por el método de Neighbor.Joining.

Cepas clínicas

siglas MALDI-TOF	Cepa	Fecha de aislamiento	Origen geográfico	Muestra	Cepa tipo más próxima en <i>rpoD</i>
C3	CCUG 61232	2012	Suecia, Göteborg	Drenaje humano. Mujer, 66 años.	<i>P. synxantha</i> (93,6%)
C5	CCUG 62564	2014	Suecia, Göteborg	Desconocido	<i>P. synxantha</i> (93,1%)
C6	CCUG 63715	2012	Suecia, Göteborg	Desconocido	<i>P. libanensis</i> (93,5%)
C15	CCUG 59542	2010	Suecia, Göteborg	Bronquio humano. Autopsia	
C17	CCUG 61063	2011	Suecia, Göteborg	Herida humana. Hombre, 62 años.	<i>P. synxantha</i> (93,3%)
C23	CCUG 64104	2014	Suecia, Göteborg	Desconocido	<i>P. veronii</i> (92,8%)
C24	CCUG 64255	2014	Suecia, Göteborg	Desconocido	<i>P. synxantha</i> (93,7%)
C26	CCUG 64356	2014	Suecia, Göteborg	Desconocido	
C27	CCUG 64384	2014	Suecia, Göteborg	Desconocido	<i>P. libanensis</i> (93,0%)
91194063	SE2	2014	Laboratorio Son Espases, Palma de Mallorca.	Espujo humano	<i>P. synxantha</i> (93,4%)
16007340	SE21	2013	Laboratorio Son Espases, Palma de Mallorca.	Espujo humano	<i>P. libanensis</i> (92,4)

Tabla 1. Información sobre las cepas clínicas utilizadas en el estudio. Se incluye el nombre de la cepa, la fecha de aislamiento, el lugar de origen y la fuente de aislamiento. Los valores de similitud en *rpoD* por debajo del 95% no pueden ser considerados lo suficientemente fiables para llevar a cabo la identificación a nivel de especie.

Cepas ambientales

Cepa	Fecha	Origen geográfico	Muestra	Cepa tipo más próxima en <i>rpoD</i>
FBF 7	2009	Amol; Irán	Naranja var. Ácida	<i>P. synxantha</i> LMG 2335 ^T (93,3%)
FBF8	2009	Amol; Irán	Naranja var. Ácida	<i>P. synxantha</i> LMG 2335 ^T (93,7%)
FBF23	2010	Babol; Irán	Naranja var. Washington Navel	<i>P. libanensis</i> CIP105460 ^T (93,7%)
FBF41	2010	Tonekabon; Irán	Naranja var. Ácida	<i>P. libanensis</i> CIP105460 ^T (93,7%)
FBF56	2009	Ramsar; Irán	Naranja var. Washington Navel	<i>P. synxantha</i> LMG 2335 ^T / <i>P. veronii</i> LMG 17761 ^T (93,2%)

Tabla 2. Listado de las muestras de origen vegetal. Se incluye el nombre de la muestra, la fecha de aislamiento, el lugar de origen y la fuente. En este caso todas las muestras son fitopatógenas.

Cepas tipo de referencia

Muestra	Cepa	Referencia
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	CCUG 12536 ^T	Iizuka y Komagata ;1963
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCUG 1253 ^T	Migula ;1895
<i>Pseudomonas synxantha</i>	CFBP 5591 ^T	Ehrenberg ;1840
<i>Pseudomonas libanensis</i>	CCUG 43190 ^T	Dabboussi <i>et al.</i> , 1999

Tabla 3. Cepas tipo empleadas, incluye el género y la especie de cada bacteria, la cepa y la referencia.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	
<i>P. fluorescens</i>	A	100																				
<i>P. synxantha</i>	B	94,98	100																			
<i>P. libanensis</i>	C	94,78	98,72	100																		
<i>P. azotoformans</i>	D	95,43	95,20	94,89	100																	
C3	E	94,97	96,16	96,05	95,96	100																
C5	F	94,85	95,89	95,78	95,54	99,27	100															
C6	G	94,82	95,90	95,86	95,74	99,23	98,83	100														
C15	H	95,01	96,43	96,39	96,00	98,75	98,57	98,68	100													
C17	I	94,97	96,01	95,90	95,62	99,38	99,89	98,90	98,64	100												
C22	J	94,89	96,00	95,89	95,65	99,49	99,45	98,94	98,75	99,53	100											
C23	K	94,47	95,74	95,67	95,47	98,72	98,46	98,90	98,42	98,53	98,42	100										
C24	L	95,01	96,43	96,40	96,01	98,76	98,57	98,68	100	98,65	98,75	98,42	100									
C26	M	94,62	95,70	95,71	95,58	98,75	98,49	98,94	98,46	98,57	98,46	99,67	98,46	100								
C27	N	94,78	95,97	95,98	95,89	98,90	98,53	98,83	99,16	98,65	98,61	98,65	99,16	98,76	100							
FBF7	O	94,78	96,01	95,90	95,89	99,31	99,12	98,76	98,64	99,20	99,31	98,39	98,65	98,50	98,65	100						
FBF8	P	94,86	96,05	95,94	95,89	99,53	99,34	98,98	98,87	99,42	99,53	98,61	98,87	98,64	98,87	99,78	100					
FBF23	Q	94,66	96,05	96,01	95,78	98,72	98,53	98,72	99,01	98,61	98,64	98,53	99,01	98,64	99,05	98,61	98,83	100				
FBF41	R	94,82	96,13	96,09	95,85	98,79	98,68	98,79	99,16	98,76	98,72	98,68	99,16	98,79	99,20	98,68	98,90	99,71	100			
FBF56	S	94,78	95,90	95,86	95,70	99,23	98,83	99,75	98,72	98,90	98,94	98,76	98,72	98,83	98,87	98,79	98,98	98,76	98,83	100		
SE2	T	94,66	95,97	95,93	95,58	98,90	98,72	99,09	98,64	98,79	98,68	99,45	98,64	99,64	98,76	98,64	98,87	98,64	98,79	98,94	100	
SE21	U	94,50	95,74	95,74	95,50	98,79	98,53	98,98	98,42	98,61	98,49	99,71	98,42	99,82	98,64	98,46	98,68	98,53	98,68	98,83	99,67	100

Tabla 4. Matriz de distancias filogenéticas (Jukes-Cantor) resultado de un análisis por MLSA de los genes 16S RNAr, *gyrB* y *rpoD* de las cepas estudiadas

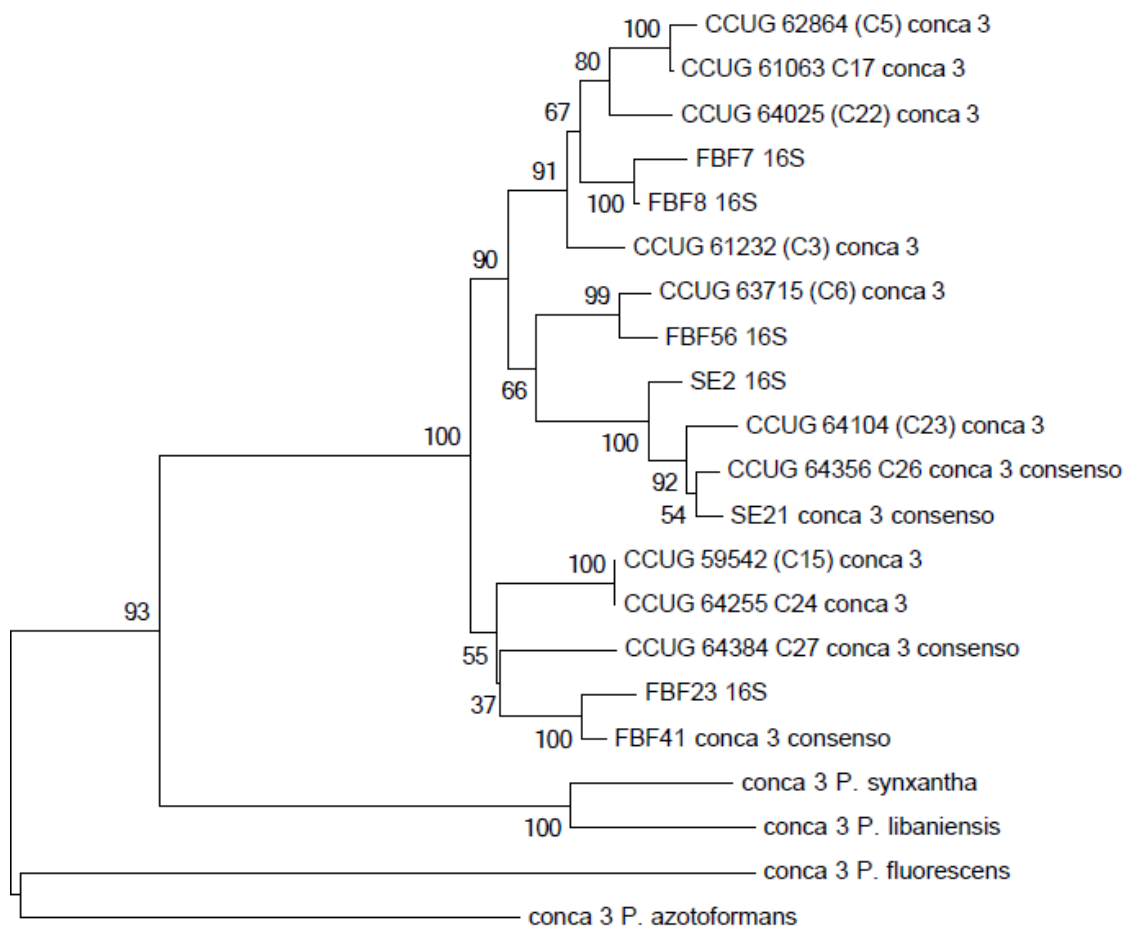


Figura 2. Representación de las distancias filogenéticas calculadas a partir del análisis por MLSA de los genes 16S RNAr, *gyrB* y *rpoD* de las cepas objeto de estudio.

3.2 Condiciones de cultivo

Las cepas cultivadas en placas de Petri con medio de cultivo LB (Luria Bertani) se siembran en tubos de ensayo (160x 66mm) con 3 ml de LB líquido (preparado según el protocolo estándar : 1g Triptona, 0,5g de extracto de levadura y 1g de NaCl (100ml)). Se incuban en la estufa a 30°C con agitación durante 48 horas. Una vez transcurridas las 48 horas se hace una segunda siembra, esta vez en tubos Falcon de 50ml con 20ml de LB líquido. Se incuban en la estufa a 30°C con agitación.

Se hace una siembra control en placas de Petri con LB de cada muestra para hacer un seguimiento de su estado y asegurarnos de que no ha habido contaminación.

3.3 Curvas de crecimiento

Paralelamente al protocolo anterior, en el momento en que se inoculan los 0,5ml de muestra a los tubos Falcon debe iniciarse la medida de la curva de crecimiento. Para ello se coge una muestra de 1 ml y se mide la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro modelo UVISpec (Pharmacia) . Las lecturas se realizan a intervalos de una hora, empezando justo en el momento en que añadimos el inóculo de los tubos de ensayo a los tubos Falcon. El valor de absorbancia que indica que las células se encuentran en la fase exponencial de crecimiento entre 0,8-1. En este momento se toma la muestra para el protocolo del análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Para realizar las gráficas de crecimiento debemos situar el tiempo en el eje abscisas y los valores de absorbancia en el eje de ordenadas. Los valores de absorbancia presentan en escala logarítmica para poder observar con mayor claridad las diferentes etapas en el crecimiento del microorganismo: etapa de latencia, crecimiento exponencial y fase estacionaria.

3.4 Protocolo WC MALDI-TOF

Debemos tener en cuenta la estructura del microorganismo a estudiar. Hay bacterias , como *Pseudomonas*, que debido a su pared celular necesitan un proceso de extracción previo para exponer las proteínas intracelulares. De otra manera no podrían ser identificadas mediante WC MALDI-TOF.

El protocolo es el siguiente, recomendado por la casa comercial Bruker (MALDI Biotyper 3.0, 2011)

1. Una vez hemos alcanzado el valor de absorbancia requerido, se depositan 2 ml de muestra en un tubo Eppendorf correctamente etiquetado
2. Centrifugar a 16.000 rpm durante un minuto en la centrífuga Eppendorf 5415D con rotor F45-24-11.
3. Se elimina el sobrenadante de la muestra. Se añade 1 ml de Ringer y agitamos en el vórtex durante unos segundos. Repetimos la centrifugación a 16000 rpm durante 1 minuto.
4. Se elimina el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol. Agitar en vórtex y centrifugar durante 2 minutos a 16.000 rpm. A partir de este momento todos los tubos deben ser Eppendorf ® para evitar la degradación que podría provocar el etanol sobre el plástico.
5. Se elimina el sobrenadante con gran precisión y se deja el tubo abierto a temperatura ambiente para secar el exceso de etanol. A partir de este punto podemos conservar la muestra a -80°C y proseguir con el protocolo en otro momento.

6. Añadimos 50µl de ácido fórmico al 70% y mezclamos con pipeta o vórtex
7. Añadimos 50 µl de acetonitrilo puro y se mezcla con cuidado, sin necesidad de vórtex.
8. Centrifugamos a 16.000rpm durante 2 minutos. Añadimos 50 µl del sobrenadante en otro tubo Eppendorf® correctamente rotulado. Se puede conservar la muestra a -80°C y continuar con el protocolo en otro momento.
9. Añadimos 1,5 µl del tubo y se deposita en la placa del analizador del aparato WC MALDI-TOF Autoflex III de la casa Bruker con cuidado.
10. Superponemos la muestra con 1 µl de ácido -ciano-4-hidroxicinámico, que actuará como matriz sólida a la que se le aplicará la carga. Dejamos secar a temperatura ambiente para permitir la cristalización.

La función de la matriz es la de exponer las proteínas intracelulares mediante la ruptura de las membranas celulares y, además, facilitar la ionización actuando como fuente de protones .La muestra es irradiada con un láser de nitrógeno que carga la matriz. Una vez ionizadas, las proteínas viajan por una cámara de vacío, donde serán detectadas.

El tiempo que tarde el fragmento en llegar al detector dependerá de la relación masa/carga (m/z) de cada fragmento.

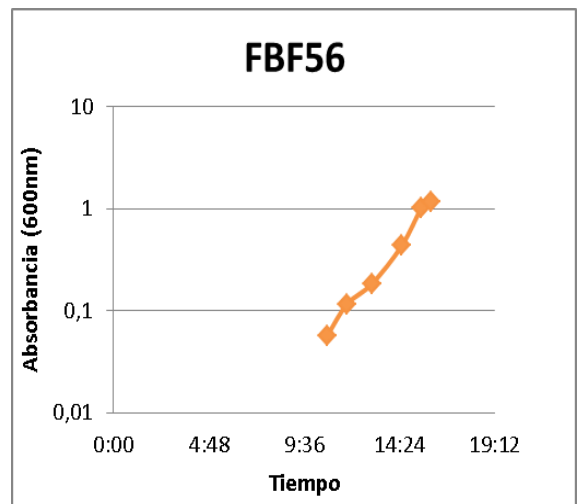
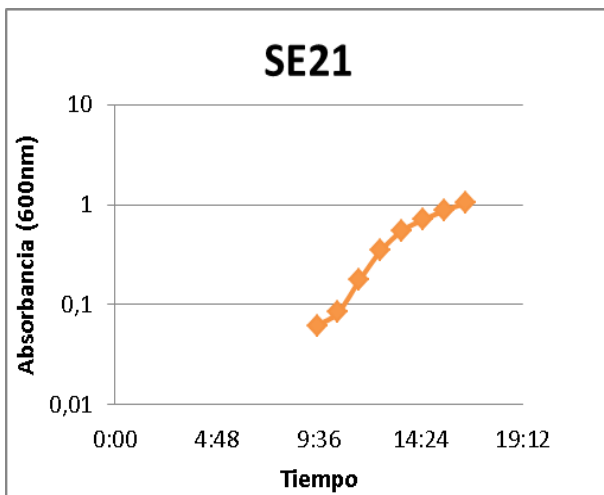
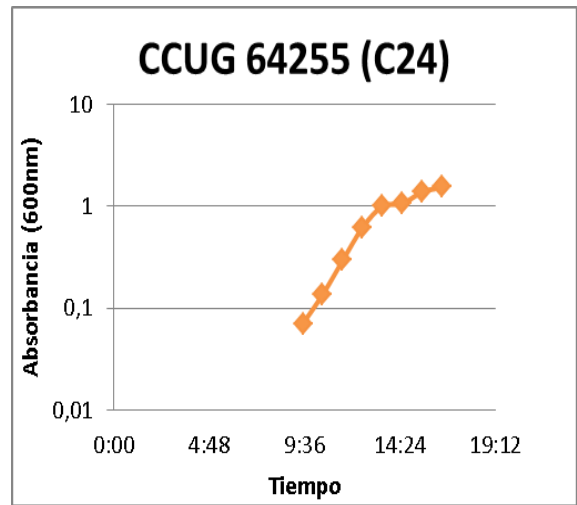
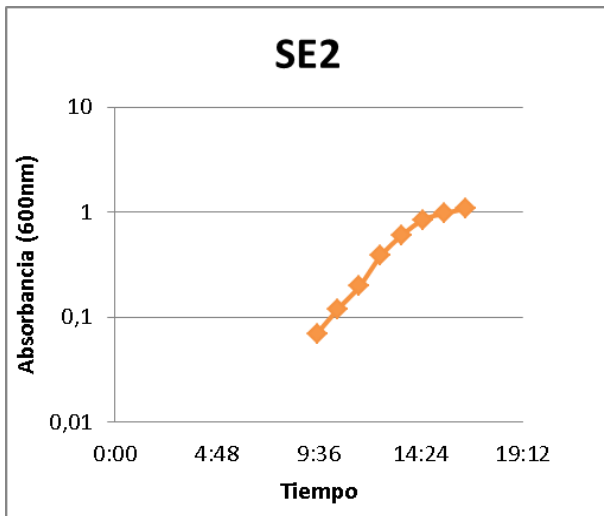
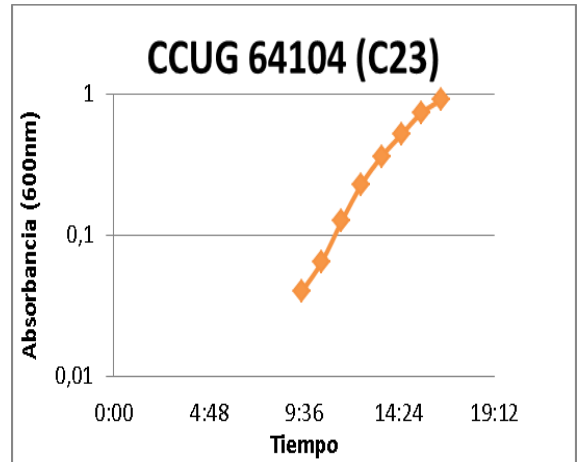
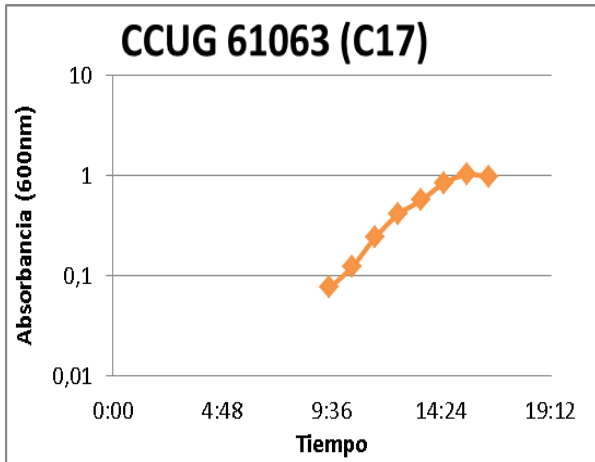
4. Resultados

Los resultados se presentan en dos bloques de información, uno que contiene los resultados de las curvas de crecimiento necesario para obtener las células en la fase exponencial del mismo y el segundo la identificación por MALDI-TOF y el análisis de los espectros obtenidos.

4.1 Curvas de crecimiento

Para realizar los ensayos, se recolectaron las células en todos los casos a una absorbancia a 600 nm entre 0,8 y 1,0, que corresponde claramente a la fase exponencial de crecimiento.

El tiempo de incubación osciló entre 4 y 6 horas. Por lo general, las tres primeras horas corresponden a la fase de adaptación o latencia.



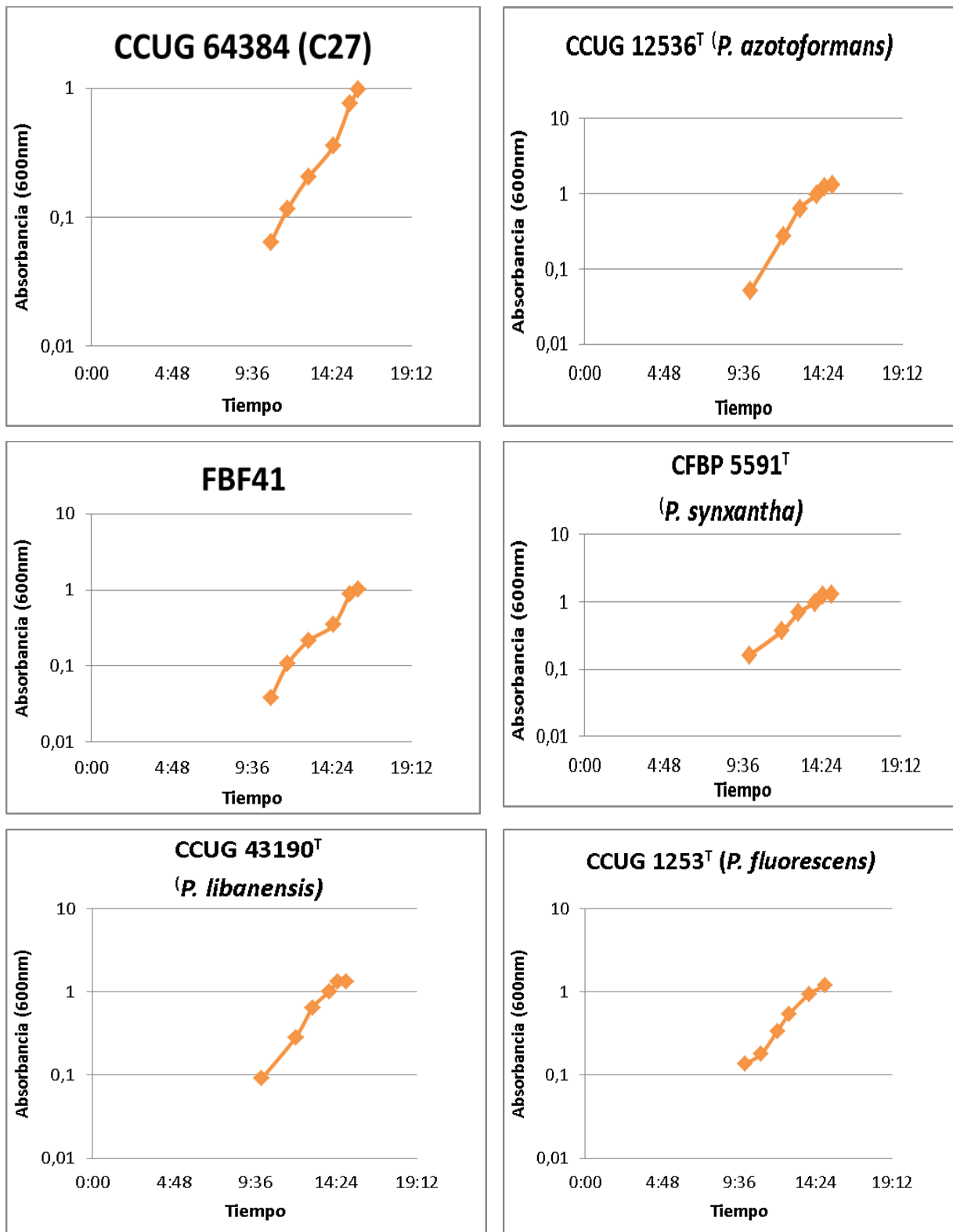


Figura 2. Representación gráfica de las curvas de crecimiento. En el eje vertical se sitúan los valores de densidad óptica tomada a 600nm. En el eje horizontal encontramos el tiempo de medida. El tiempo máximo de medida es de 26 horas, y el tiempo mínimo es de 8.

4.2 Identificación por MALDI-TOF

De las 4 cepas tipo de referencia en programa Biotyper identifica con un elevado nivel de fiabilidad a *P. libanensis* a *P. fluorescens*. La cepa tipo de *P. synxantha* se identifica en 8 réplicas como *P. libanensis* y en 4 como *P. synxantha*. La cepa tipo de *P. azotoformans* se identifica con fiabilidad en 2 réplicas como *P. azotoformans*, en 4 como *P. antactica* y 1 como *P. libanensis*.

Fecha	Muestra	Posición WC MALDI-TOF		Identificación	Valor de identificación
11/12/2014	C27	A	10-12	<i>P. fluorescens</i>	2,079 VVV
11/12/2014	C27'	A	13-15	<i>P. fluorescens</i>	1,968NNN
11/12/2014	FBF23	A	16-18	<i>P. libanensis</i>	2,089 VVN
11/12/2014	FBF23'	A	19-21	<i>P. libanensis</i>	2,101 VVV
11/12/2014	FBF41	A	22-24	<i>P. libanensis</i>	2,149 VVV
11/12/2014	FBF41'	B	1-3	<i>P. libanensis</i>	2,149
11/12/2014	FBF56	B	4-6	<i>P. libanensis</i>	2,181 VVN
11/12/2014	FBF56'	B	7-9	<i>P. libanensis</i>	2,036 VVN
17/11/2014	C3	A	4-6	<i>P. libanensis</i>	2,286_V
17/11/2014	C3'	A	7-9	<i>P. libanensis</i>	2,252 VVV
17/11/2014	C5	A	10-12	<i>P. libanensis</i>	2,214_V_
17/11/2014	C5'	A	13-15	<i>P. synxantha</i>	2,271 VVV
17/11/2014	C6	A	16-18	<i>P. synxantha</i>	2,27 VVV
17/11/2014	C6'	A	19-21	<i>P. synxantha</i>	2,299VVV
17/11/2014	C15	A	22-24	<i>P. fluorescens</i>	2,226 VVV
17/11/2014	C15'	B	1-3	<i>P. fluorescens</i>	2,319 VVV
05/12/2014	C17	A	4-6	<i>P. libanensis</i>	2,153 VVV
05/12/2014	C17'	A	7-9	<i>P. synxantha</i>	2,220 VVV
05/12/2014	C23	A	10-12	<i>P. fluorescens</i>	2,118 VVV
05/12/2014	C23'	A	13-15	<i>P. fluorescens</i>	2,152 VVV
05/12/2014	C24	A	16-18	<i>P. fluorescens</i>	2,210 VVV
05/12/2014	C24'	A	19-21	<i>P. fluorescens</i>	2,139 VNV
05/12/2014	SE2	A	22-24	<i>P. synxantha</i>	2,224 VVN
05/12/2014	SE2'	B	1-3	<i>P. fluorescens</i>	2,179 VVV
05/12/2014	SE21	B	4-6	<i>P. fluorescens</i>	2,190 VVV
05/12/2014	SE21'	B	7-9	<i>P. fluorescens</i>	2,070 VVV
19/12/2014	C6	I	7-9	<i>P. fluorescens</i>	2,146 VVV
19/12/2014	C6'	I	10-12	<i>P. fluorescens</i>	2,098 VVN
19/12/2014	C22	I	13-15	<i>P. libanensis</i>	2,221 VVV
19/12/2014	C22'	I	16-18	<i>P. libanensis</i>	2,124 VVV
19/12/2014	FBF7	I	19-21	<i>P. libanensis</i>	2,138 NVV
19/12/2014	FBF7'	I	22-24	<i>P. antártica</i>	2,172 VVN
19/12/2014	FBF8	J	1-3	<i>P. synxantha</i>	2,160 VVV
19/12/2014	FBF8'	J	4-6	<i>P. libanensis</i>	2,203 VVV
19/12/2014	FBF23	J	7-9	<i>P. libanensis</i>	2,258 VVV
19/12/2014	FBF23'	J	10-12	<i>P. fluorescens</i>	2,130 VNV
26/02/2015	<i>P. azotoformans</i>	E	19-21	<i>P. azotoformans</i>	2,206 VVV
26/02/2015	<i>P. azotoformans</i> '	E	22-24	<i>P. antarctica</i>	2,136 VVV
26/02/2015	<i>P. libanensis</i>	F	1-3	<i>P. libanensis</i>	2,13-2,34VVV
26/02/2015	<i>P. libanensis</i> '	F	4-6	<i>P. libanensis</i>	2,13-2,34VVV
26/02/2015	<i>P. synxantha</i>	F	7-9	<i>P. libanensis</i>	1,976-2,052VVV
26/02/2015	<i>P. synxantha</i> '	F	10-12	<i>P. synxantha</i>	2,18-2,19VVV
25/03/2015	<i>P. fluorescens</i>	N	4-6	<i>P. fluorescens</i>	2,17-2,28VVV
25/03/2015	<i>P. fluorescens</i> '	N	7-9	<i>P. fluorescens</i>	2,12-2,21VVV

Tabla 3. Posición de las muestras en WC MALDI-TOF ; incluye la fecha, el volumen inoculado y la cepa más próxima. En la tabla se muestran las cepas analizadas indicando el microorganismo que le ha sido asignado por la base de datos Biotyper, según la similitud de sus espectros proteicos. Si el valor de similitud es igual o superior a 2 , la identificación es segura a nivel de género y probable a nivel de especie. Por el contrario, si el valor se encuentra entre 1,7 y 1,99 la identificación a nivel de género es probable pero no segura. Si el valor se encuentra por debajo de 1,7 la identificación no es posible.

Tal como se observa en la Tabla 3, las cepas problema objeto de estudio se identifican a nivel de género, pero ninguna se identifica con fiabilidad suficiente a nivel de especie. Ninguna de ellas puede adscribirse a alguna de las cepas tipo estudiadas que son las más próximas en el análisis filogenético.

4.3 Dendrograma

Con el mismo programa utilizado para la identificación (Biotyper) se ha generado una matriz de similitud entre los perfiles proteicos mediante la herramienta CCI (“composite correlation index”). Esta matriz se ha utilizado para generar un dendrograma representativo de las asociaciones de perfiles proteicos de las diferentes cepas (Figura 3).

El dendrograma se ha generado con el programa PERMUT Matrix (Caraux, y Pinloche, 2005). Se observa claramente que los aislados no se agrupan con ninguna de las cepas tipo de especie estudiadas y que éstas se diferencian muy bien entre sí. Las cepas problema se organizan en tres agrupamientos y los duplicados de una misma cepa se incluyen siempre en su mismo agrupamiento.

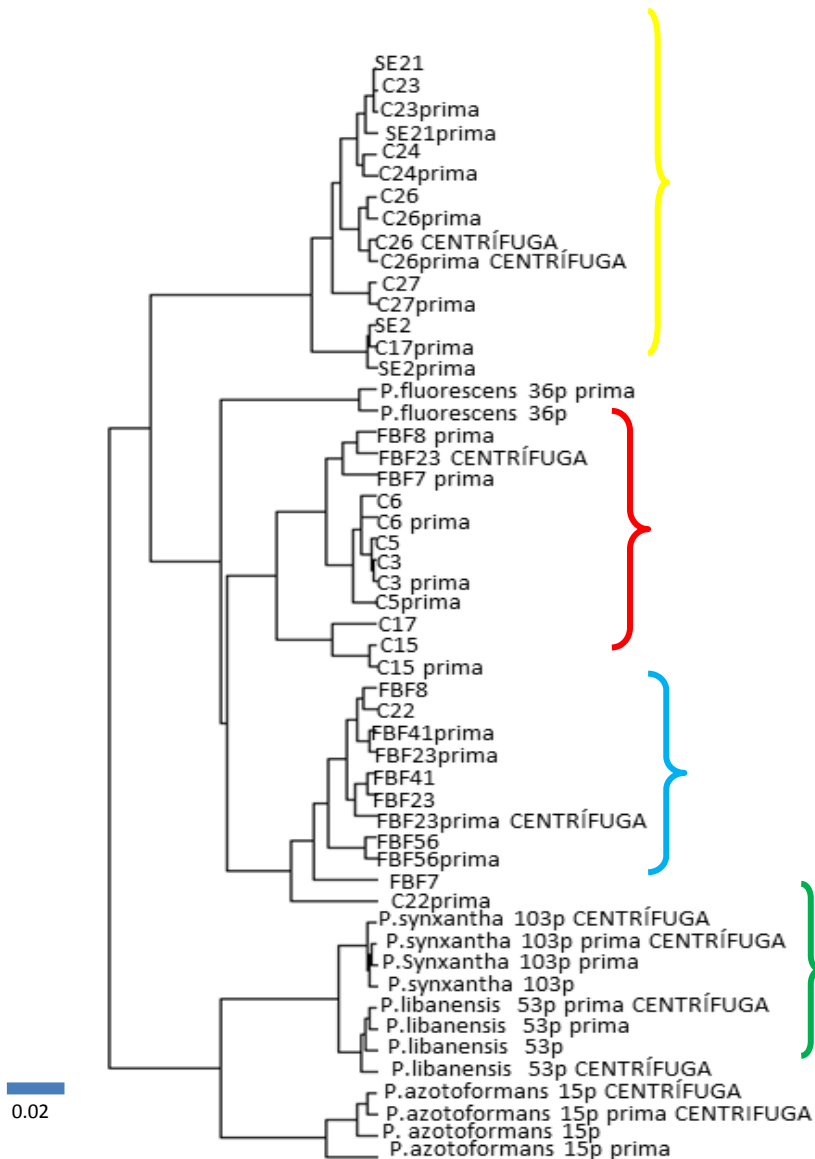


Figura 3. Dendrograma por UPGMA creado a partir de la matriz de semejanza del programa Biotyper. Se indican los agrupamientos proteicos de las cepas de *Pseudomonas* analizadas. El primer agrupamiento se indica en la figura con el color amarillo, el segundo en color rojo, el tercero en color azul y el cuarto en color verde.

5. Discusión y conclusiones

5.1 Curvas de crecimiento

Lo primero que se debe tener en cuenta es que todas las muestras siguen mismo un patrón de crecimiento para que las células a analizar por MALDI-TOF estén siempre en la fase exponencial. Experimentos previos demostraron que los perfiles proteicos de células en la fase

estacionaria difieren de los de las células en la fase exponencial. En general, todas las muestras alcanzan la fase estacionaria pasadas las 5-6 horas de cultivo, etapa que corresponde con la fase de crecimiento exponencial. Una vez se alcanza la fase estacionaria, el valor de células bacterianas se mantiene constante.

No hay aumento de células ya que las tasas de crecimiento se igualan con las tasas de muerte bacteriana.

5.2 Identificación mediante secuencia parcial del gen *rpoD*

Las cepas del estudio han sido analizadas mediante la secuencia parcial del gen *rpoD*, tal y como se indica en la Tabla 1 y en la Tabla 2. Los resultados de este análisis han dado valores inferiores al 95% necesario para asegurar una correcta identificación a nivel de especie.

Por lo tanto, podemos afirmar que la identificación de las cepas mediante secuencia parcial del gen *rpoD* es correcta a nivel de género, pero no podemos afirmar que lo sea a nivel de especie.

5.3 Identificación de los microorganismos por espectrometría de masas

En la tabla 3 se muestran las identificaciones calculadas a partir de la comparación de los espectros de absorción de nuestras cepas con las de la base de datos del programa Biotyper. Este programa tiene una finalidad principalmente clínica, por lo tanto se incluyen en él mayoritariamente cepas de interés clínico, y también algunas cepas tipo de referencia como las que hemos utilizado en el presente estudio. En nuestro caso las cepas tipo se han identificado como *P. libanensis*, *P. fluorescens*, *P. synxantha* y *P. antarctica*. El error en la identificación de un duplicado de *P. azotoformnas* como *P. antártica* y un duplicado de *P. synxantha* como *P. libanensis* puede atribuirse a que en la base de datos de Biotyper únicamente están los espectros de las cepas tipo de estas especies filogenéticamente muy próximas, como es el caso.

Prácticamente todos los análisis de las cepas problema presentan valores superiores a 2, por lo tanto, podemos afirmar que presentan una buena identificación a nivel de género y probablemente especie. La única muestra que presenta un valor inferior a 2 es la muestra C27' (identificada como *P. fluorescens*) por lo que no podemos afirmar que se haya identificado correctamente la especie, aunque sí el género. Sin embargo, teniendo en cuenta que la base de datos que utiliza el programa Biotyper no incluye todas las cepas del género, es posible que de aumentar el número de cepas en la base de datos la identificación hubiera sido diferente. Las cepas problema se han identificado como miembros de las especies *P. fluorescens*, *P. libanensis*, *P. synxantha* o *P. antarctica*, que son las especies filogenéticamente más próximas, pero el valor de identificación de 2,300 se alcanza en una sola

identificación y éste es el valor que es el que el programa Biotyper considera como de probabilidad alta de identificación a nivel de especie. Todos los demás quedan entre 2,000 y 2,299 que equivalen a una identificación segura a nivel de género y sólo probable a nivel de especie.

Podemos concluir que no ha sido posible adscribir ninguna de nuestras muestras a especies conocidas del género *Pseudomonas* , por falta de datos de similitud suficientemente elevados.

5.4 Asociaciones proteicas y dendrograma

En la figura 3 se representa el dendrograma calculado a partir de las asociaciones proteicas generadas por el programa Biotyper.

Se puede observar que las cepas SE21,SE2, C23, C24, C26 Y C27 se han agrupado en un “cluster” común, lo que podría indicar que todas ellas forman parte de la misma especie.

Las cepas FBF8, FBF23, FBF7, C6, C5, C3, C17 y C15 también deberían podrían ser consideradas miembros de la misma especie , posiblemente distinta a la anterior en los perfiles proteicos. Siguiendo el mismo razonamiento, las cepas C22, FBF41, FBF23, FBF56 y FBF7 representan un “cluster” común, representando a una posible especie nueva.

Los datos de la similitud de los espectros proteicos de todas ellas, calculados a partir de MALDI-TOF y la similitud calculada a partir de la secuencia parcial del gen *rpoD* se muestran indicados en las siguientes tablas.

Resultados de similitud mediante MALDI-TOF y secuencia parcial del gen *rpoD* del primer “cluster”

	SE21	SE21 ‘	C23	C23 ‘	C24	C24 prima	C26	C26 ‘	C27	C27 ‘
SE21	1	0,9	0,94	0,95	0,88	0,88	0,90	0,89	0,85	0,84
SE21 ‘	0,9	1	0,88	0,89	0,85	0,85	0,82	0,82	0,80	0,81
C23	0,94	0,88	1	0,93	0,87	0,86	0,87	0,88	0,83	0,82
C23 ‘	0,95	0,89	0,93	1	0,87	0,87	0,90	0,89	0,86	0,84
C24	0,88	0,85	0,87	0,87	1	0,90	0,84	0,81	0,79	0,78
C24 ‘	0,88	0,85	0,86	0,87	0,90	1	0,83	0,82	0,81	0,80
C26	0,9	0,82	0,87	0,9	0,84	0,83	1	0,92	0,85	0,82
C26 ‘	0,89	0,82	0,88	0,89	0,81	0,82	0,92	1	0,90	0,89
C27	0,85	0,80	0,83	0,86	0,79	0,81	0,85	0,90	1	0,93
C27 ‘	0,84	0,81	0,82	0,84	0,78	0,80	0,82	0,89	0,93	1

Tabla 4. Resultados de la asociación proteica de las cepas que forman el primer “cluster” (señalado en amarillo en la figura 3) mediante MALDI-TOF

	SE21	C23	C24	C26	C27
SE21	100	99,7	98,4	99,8	98,6
C23	99,7	100	98,4	99,7	98,6
C24	98,4	98,4	100	98,5	99,2
C26	99,8	99,7	98,5	100	98,8
C27	98,6	98,6	99,2	98,8	100

Tabla 5. Resultados de la similitud mediante secuenciación parcial del gen *rpoD*. Las cepas analizadas pertenecen al primer “cluster”.

Resultados de similitud mediante MALDI-TOF y secuencia parcial del gen *rpoD* del segundo “cluster”

	FBF8 ‘	FBF23	FBF7	C6	C6 ‘	C5	C5 ‘	C3	C3 ‘	C17	C15	C15 ‘
FBF8 ‘	1	0,83	0,84	0,80	0,74	0,81	0,85	0,85	0,86	0,76	0,77	0,79
FBF23	0,90	1	0,87	0,80	0,74	0,76	0,81	0,80	0,83	0,72	0,71	0,74
FBF7	0,84	0,87	1	0,76	0,70	0,75	0,80	0,77	0,80	0,62	0,66	0,70
C6	0,80	0,80	0,76	1	0,91	0,89	0,87	0,88	0,90	0,80	0,82	0,85
C6 ‘	0,74	0,76	0,70	0,91	1	0,91	0,86	0,89	0,88	0,77	0,82	0,85
C5	0,81	0,76	0,75	0,89	0,91	1	0,89	0,94	0,63	0,80	0,83	0,85
C5 ‘	0,85	0,83	0,82	0,87	0,86	0,89	1	0,89	0,90	0,76	0,80	0,83
C3	0,85	0,80	0,77	0,88	0,89	0,94	0,89	1	0,96	0,82	0,83	0,86
C3 ‘	0,86	0,90	0,80	0,90	0,88	0,93	0,90	0,96	1	0,83	0,83	0,87
C17	0,76	0,81	0,62	0,80	0,77	0,80	0,76	0,82	0,83	1	0,78	0,80
C15	0,77	0,77	0,66	0,82	0,82	0,83	0,80	0,83	0,83	0,78	1	0,91
C15 ‘	0,79	0,74	0,70	0,85	0,85	0,85	0,83	0,86	0,87	0,80	0,91	1

Tabla 6. Resultado de la agrupación por MALDI-TOF de las cepas que forman el segundo cluster, identificado como una especie nueva, señalada en la figura 3 en color rojo.

	FBF8 prima	FBF 23	FBF7	C6	C5	C3	C17	C15
FBF8 prima	100	98,8	99,8	99,0	99,3	99,5	99,4	98,9
FBF23	98,8	100	98,6	98,7	98,5	98,7	98,6	99,0
FBF7	99,8	99,8	100	98,8	99,1	99,3	99,3	99,1
C6	99,0	98,7	98,8	100	98,8	99,2	98,9	98,7
C5	99,3	98,7	99,3	98,9	100	99,4	99,9	98,6
C3	99,5	98,7	99,3	99,2	99,4	100	99,4	98,8
C17	99,4	98,6	99,3	98,9	99,9	99,4	100	98,6
C15	98,9	99,0	99,1	98,7	98,6	98,8	98,6	100

Tabla 7. Resultado de la secuenciación parcial del gen *rpoD* para las cepas que forman el segundo cluster.

Resultados de similitud mediante MALDI-TOF y secuencia parcial del gen *rpoD* del tercer “cluster”

	FBF8	C22	C22 ‘	FBF41	FBF41‘	FBF23	FBF23‘	FBF56	FBF56‘	FBF7
FBF8	1	0,93	0,80	0,90	0,94	0,90	0,92	0,83	0,85	0,91
C22	0,80	1	0,81	0,90	0,92	0,89	0,91	0,82	0,83	0,84
C22 ‘	0,93	0,81	1	0,87	0,83	0,85	0,82	0,80	0,80	0,89
FBF41	0,90	0,90	0,87	1	0,93	0,93	0,93	0,87	0,87	0,90
FBF41‘	0,94	0,92	0,83	0,93	1	0,93	0,95	0,86	0,88	0,88
FBF23	0,92	0,89	0,85	0,93	0,93	1	0,92	0,87	0,88	0,87
FBF23‘	0,86	0,91	0,82	0,93	0,95	0,92	1	0,76	0,76	0,81
FBF56	0,83	0,82	0,80	0,87	0,86	0,87	0,76	1	0,91	0,80
FBF56‘	0,85	0,83	0,80	0,87	0,88	0,88	0,76	0,91	1	0,81
FBF7	0,91	0,84	0,89	0,90	0,88	0,87	0,81	0,80	0,81	1

Tabla 8. Resultado de la agrupación por MALDI-TOF de las cepas que pertenecen al tercer “cluster”, identificado en la figura 3 con la marca azul.

	FBF8	C22	FBF41	FBF23	FBF56	FBF7
FBF8	100	99,5	98,9	98,8	99,0	99,8
C22	99,5	100	98,7	98,6	98,9	99,3
FBF41	98,9	98,7	1	99,7	98,8	98,7
FBF23	98,8	98,6	99,7	1	98,8	98,6
FBF56	99,0	98,9	98,8	98,8	1	98,8
FBF7	99,8	99,3	98,7	98,6	98,8	98,81

Tabla 9. En esta tabla se incluyen los resultados de similitud entre las cepas que forman el tercer cluster mediante secuenciación parcial del gen *rpoD*.

Resultados de similitud mediante MALDI-TOF y secuencia parcial del gen *rpoD* de las cepas tipo *P. synxantha* y *P. libanensis* cuarto “cluster”

	<i>P. libanensis</i> 53p	<i>P. libanensis</i> 53p ‘	<i>P. synxantha</i> 103p	<i>P. synxantha</i> 103p‘
<i>P. libanensis</i> 53p	1	0,90	0,82	0,85
<i>P. libanensis</i> 53p ‘	0,90	1	0,85	0,86
<i>P. synxantha</i> 103p	0,82	0,85	1	0,91
<i>P. synxantha</i> 103p‘	0,85	0,86	0,91	1

Tabla 10. Resultados de similitud entre *P. libanensis* y *P. synxantha* calculados a partir de MALDI-TOF.

	<i>P.libanensis</i> 53p	<i>P. synxantha</i> 103p
<i>P. libanensis</i> 53p	100	98,7
<i>P. synxantha</i> 103p	98,7	100

Tabla 11. Resultados de similitud entre *P. libanensis* y *P. synxantha* calculados a partir de la secuenciación parcial del gen *rpoD*

5.5 Conclusiones

Como conclusión general podemos afirmar que la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF puede ser utilizada para la identificación de cepas del género *Pseudomonas* siempre que en la base de datos estén incluidas todas las especies reconocidas dentro del género y a ser posible, por más de una cepa por especie.

Los espectros proteicos son fácilmente representables y se pueden elaborar dendrogramas que concuerdan con la cercanía filogenética. No obstante, la existencia de cepas de especies filogenéticamente muy cercanas puede dar lugar a confusión, dificultando el grado de discriminación a nivel de especie.

Los valores de similitud calculados mediante MALDI-TOF y mediante la secuenciación parcial del gen *rpoD* indican que las cepas objeto de este estudio son muy próximas, por lo que es probable que las cepas estudiadas sean cepas distintas de una misma especie, aún por identificar, puesto que no se pueden adscribir a ninguna de las especies conocidas.

Los datos apuntan a que existe una cercanía filogenética significativamente elevada entre las cepas del estudio, por lo tanto, la asociación de estas cepas en agrupamientos bien diferenciados (figura 3) podría indicar que se trata de la misma especie y que no ha habido suficiente discriminación entre ellas. Otras técnicas, como el análisis comparado de genomas permitirán seguramente aclarar estas dudas.

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que han podido invertir un minuto de su tiempo en ayudar y hacer posible este estudio, sobre todo a la Dra. Rosa Gomila de los servicios científico- técnicos de la UIB por la adquisición de los espectros de MALDI-TOF, y en especial a la Dra. Magdalena Mulet del área de Microbiología, quien ha supervisado todos los aspectos experimentales de la presente memoria.

Referencias bibliográficas

Caprioli, R. M., Farmer, T. B., & Gile, J. (1997). Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Analytical chemistry*, 69(23), 4751-4760.

Cornelis, P. (Ed.). (2008). *Pseudomonas: genomics and molecular biology*. Horizon Scientific Press.

De Bruyne, K., Slabbinck, B., Waegeman, W., Vauterin, P., De Baets, B., & Vandamme, P. (2011). Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Systematic and applied microbiology*, 34(1), 20-29.

Dowling, D. N., & O'Gara, F. (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology*, 12(4), 133-141

Govan, J. R. W., Fyfe, J. A. M., & Jarman, T. R. (1981). Isolation of alginate-producing mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. *Journal of general microbiology*, 125(1), 217-220.

Hotta, Y., Teramoto, K., Sato, H., Yoshikawa, H., Hosoda, A., & Tamura, H. (2010). Classification of Genus *Pseudomonas* by MALDI-TOF MS Based on Ribosomal Protein Coding in S10spc- alpha Operon at Strain Level. *Journal of proteome research*, 9(12), 6722-6728.

Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., & Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 510-547.

Lay, J. O. (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria*. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(4), 172-194.

Lebeque Pérez, Y., Morris Quevedo, H. J., & Calás Viamonte, N. (2006). Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Cubana de medicina*, 45(1), 0-0.

Makhzoum, A., Knapp, J. S., & Owusu, R. K. (1995). Factors affecting growth and extracellular lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D. *Food microbiology*, 12, 277-290.

Mulet, M., Gomila, M., Lemaitre, B., Lalucat, J., Garcia-Valdes, E. 2012. *Taxonomic characterization of Pseudomonas strain L48 and formal proposal of Pseudomonas entomophila sp. nov.* *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 145–149.

Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., ... & Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 4(12), 799-808.

O'sullivan, D. J., & O'Gara, F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological reviews*, 56(4), 662-676.

Palleroni, N. J. 1992. Present *situation of the taxonomy of aerobic pseudomonads*. In: E. Galli, S. Silver, and B. Witholt (Eds.) *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. ASM Press. Washington, DC. 105–115.

Palleroni, N. J. (2008). The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*, 1-18.

Palleroni, N. J. (1981). Introduction to the family Pseudomonadaceae. In *The prokaryotes* (pp. 655-665). Springer Berlin Heidelberg.

Caraux, G., & Pinloche, S. (2005). PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics*, 21(7), 1280-1281.

Scotta, C., Gomila, M., Mulet, M., Lalucat, J. & García-Valdés, E. 2013. Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry and Multilocus Sequence Analysis in the Discrimination of *Pseudomonas stutzeri* Populations: Three Novel Genomovars. *Microb Ecol*. DOI 10.1007/s00248-013-0246-8.

Stockwell, V. O., & Loper, J. E. (2005). The sigma factor RpoS is required for stress tolerance and environmental fitness of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Microbiology*, 151(9), 3001-3009.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., ... & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959-964.

Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (1996). Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In *Plant-microbe interactions* (pp. 187-235). Springer US.

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A., & Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrgeneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, *146*(10), 2385-2394.